

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：82613

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23700947

研究課題名(和文) 食事からの抗酸化物質摂取総量の推算を可能とする食品の抗酸化能データベースの構築

研究課題名(英文) The development of a food antioxidant capacity database to estimate antioxidant intake from whole foods

研究代表者

竹林 純 (Takebayashi, Jun)

独立行政法人国立健康・栄養研究所・食品保健機能研究部・精度管理担当研究員(主任)

研究者番号：30421837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：食品の抗酸化能データベースの構築について検討し、以下の成果を得た。
(1)食品の抗酸化能測定方法であるORAC法の測定結果が希釈倍率に影響されることを明らかにし、方法を改良して分析精度を向上した。(2)肉、魚類等の動物性食品の中には、野菜、果物類に匹敵する抗酸化能を有する食品があることを明らかにした。(3)動物性食品の抗酸化能に寄与する物質として一部のアミノ酸が考えられることを示した。(4)調理により抗酸化能が増加する場合と減少する場合があることを示した。
今後、食事からの抗酸化物質の摂取が健康に及ぼす影響を明らかにするための疫学研究の基礎データとなる食品の抗酸化能データベースを更に拡充したい。

研究成果の概要(英文)：To develop a food antioxidant capacity database, the following results were obtained.

(1) The ORAC assay, which is one of the method to measure antioxidant capacities, was found to have a methodological defect, that is, dilution ratio of tested solutions could affect ORAC values. Thus, the method for the ORAC assay was improved to provide good analytical precision. (2) Some of animal foods such as fishes and meats had considerable antioxidant capacities comparable to vegetables and fruits. (3) Some amino acids may be contributors for antioxidant activities of animal foods. (4) Antioxidants capacities were changed both positively and negatively after cooking.

The quantity and quality of the food antioxidant capacity database obtained here needs to be increased more to be used an epidemiological study in order to clarify the relationship between daily antioxidant intake and health.

研究分野：食品分析

キーワード：抗酸化能 食品 ORAC法 データベース 動物性食品 アミノ酸 調理

1. 研究開始当初の背景

食品に含まれている抗酸化物質は生活習慣病をはじめ種々の疾病の予防因子として大きな注目を集めている。抗酸化物質を豊富に含む野菜・果物類の十分な摂取が健康に良好な影響を及ぼすことは多数の疫学研究から裏付けられているが (JAMA, **293**, 183-193 (2005); Am. J. Epidemiol., **172**, 1268-1279 (2010))、抗酸化サプリメントの有用性については明確な結論が得られていない。2007年に発表された Bjelakovic らによる疫学研究論文のメタ分析によると (JAMA, **297**, 842-857 (2007))、ビタミン C 及びセレンウムに関しては総死亡率に無影響であり、ベータカロテン、ビタミン A、ビタミン E に関しては総死亡率を増加させる可能性がある、という結果が得られている。このことは、単一あるいは少数の抗酸化物質の大量摂取では、充分量の野菜・果物摂取と同等の有用性が得られないだけでなく、場合によっては安全性に問題が生じる可能性があることを示唆している。一般的に、我々は通常の食事から複数の抗酸化物質を組み合わせて摂取しており、我々の体内ではこれら食品由来の抗酸化物質と生体内で合成された抗酸化物質がネットワークを形成し、酸化ストレスを消去している。従って、個々の食品や抗酸化物質のみに着目するのではなく、食品中に含まれる抗酸化物質の総合的な活性 (Antioxidant Capacity, AOC) に着目した研究が求められていた。

必須栄養素であるビタミン C 及び E も抗酸化物質であるため、我々は日常的にある程度の量の抗酸化物質を摂取している。従って、食品の抗酸化機能が健康に及ぼす影響を考える際には、日常的な食事からの抗酸化物質摂取を把握することが重要である。そのために、著者らはこれまでに、日本において一般的に食されている 23 種類の野菜及び 13 種類の果物に着目して、その親水性抗酸化物質の含有量について評価を行った (Biosci. Biotech. Biochem., **74**, 2137-2140 (2010); J. Food Compos. Anal., **29**, 25-31 (2013))。しかし、食事全体からの抗酸化物質摂取量を把握するためにはこれらの野菜・果物類以外の抗酸化能を測定し、さらにデータを充実させる必要があった。また、これまでの測定に用いた野菜・果物は全て生鮮品であったが、一般的に調理して食すものが多く含まれるため、調理加工の影響も明らかにする必要があった。

2. 研究の目的

食品中に含まれる抗酸化物質が健康に及ぼす影響を明らかにするには、食事記録等を基に抗酸化物質摂取総量を数値化し、その健康影響を評価する疫学研究が有効だと考えられる。疫学研究実施のためには、各食品 AOC 値のデータベースが必要不可欠である。本研究では、その基礎となる食品の抗酸化能

データベースの拡充を図るため、以下の研究を実施した。

I. 抗酸化能測定値の再現性向上に関する研究

著者らは、AOC 評価法として Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) 法を用いてきた。ORAC 法においては、測定を行う際に試験溶液の希釈を行うが、検討の過程で、測定結果が希釈倍率の影響を受けている可能性が考えられた。そこで、抗酸化物質標準溶液を使用し、測定結果の希釈倍率依存性について詳細に検討するとともに、再現性を高める方法を考案した。

II. 動物性食品の抗酸化能の測定

植物性食品 (野菜類、果物類) の抗酸化活性と比較して、動物性食品 (肉類、魚介類、卵類) の抗酸化活性に関する報告は極めて少ない。特に、特に野菜や果物と同一の分析方法を用いて動物性食品の抗酸化能を比較した研究は調べた限り見当たらなかった。日本人は日常的にかなりの量の動物性食品を摂取している。摂取量を勘案すると、動物性食品からの抗酸化物質摂取は無視できない可能性が考えられた。そこで、代表的な動物性食品について、その AOC を測定した。

III. 動物性食品の抗酸化能に寄与する物質に関する検討: アミノ酸の抗酸化能の測定

動物性食品の抗酸化能を評価した結果、比較的高い抗酸化能を有するものがあることが明らかとなった。ORAC 活性を有するペプチドが報告されていることから (J. Agric. Food Chem., **60**, 5431-5437 (2012))、たんぱく質の寄与を考え、20 種類のアミノ酸標準品について抗酸化活性を測定した。

IV. 調理が抗酸化能に及ぼす影響に関する研究

これまでの測定には全て生鮮品を用いたが、調理して食す場合も多いことから、調理が抗酸化能に及ぼす影響について検討した。

3. 研究の方法

食品検体は市販品を購入し、凍結乾燥した後ミキサーで粉末とした。凍結乾燥粉末からの抗酸化物質の抽出は、高速溶媒抽出装置を用いて親油性物質と親水性物質を連続して抽出する Wu らの方法 (J. Agric. Food Chem., **52**, 4026-4037 (2004)) に準じて行った。検体が抗酸化物質標準品の場合は、メタノール/水/酢酸=90/9.5/0.5 (MWA) 溶液に溶解した。検体がアミノ酸標準品の場合は、1 M 塩酸水溶液又は 1 M 水酸化ナトリウム水溶液に溶解して調製した。

AOC の測定には、ビタミン C、ポリフェノール類等の親水性抗酸化物質の抗酸化力を反映する Hydrophilic-ORAC (H-ORAC) 法を用いた (Anal. Sci., **28**, 159-165 (2012))。適宜希釈を行った食品抽出液、抗酸化物質又はアミノ酸標準品を 35 μ L ずつ 96 穴マイ

クプレートに分注した。蛍光色素 Fluorescein のリン酸緩衝液溶液 (110.7 nM) を 115 μ L 分注し、37 $^{\circ}$ C で 10 分間保温した。37 $^{\circ}$ C に予め保温した蛍光プレートリーダーで励起波長 485 nm、検出波長 528 nm の蛍光強度を測定した後、ラジカル発生剤 AAPH (2,2'-azobis(2-aminopropane)dihydro-chloride) のリン酸緩衝液溶液 (31.7 mM) を 50 μ L 分注し、蛍光強度を経時的に測定した (2 分間隔で 90 分間)。0 (ブランク)、6.25、12.5、25、50 μ mol/L の Trolox (Trolox、抗酸化物質標準品) 溶液についても同様に測定を行った。時間を X 軸に、相対蛍光強度を Y 軸にプロットし、各検体の曲線下面積 (AUC) を算出し、ブランクの AUC を差し引いて net AUC を求めた (図 1)。検体の net AUC と、Trolox 標準液の net AUC から、各検体の抗酸化能を計算した。結果は、検体 1 g に含まれる抗酸化物質と同等の活性を示す Trolox のモル量 (μ mol-Trolox equivalent (TE)/g) で表した。

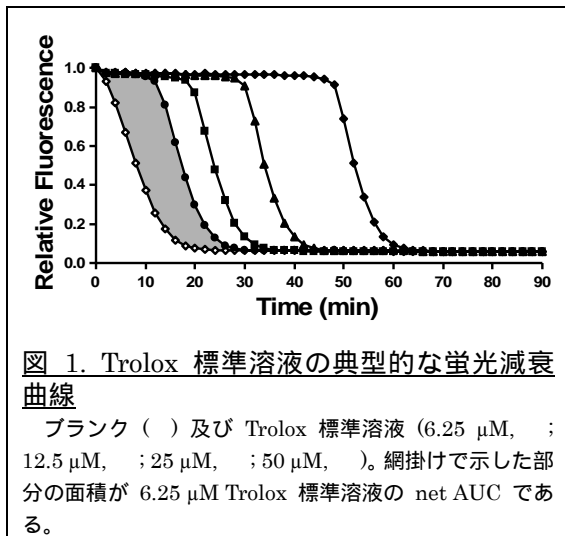


図 1. Trolox 標準溶液の典型的な蛍光減衰曲線

ブランク () 及び Trolox 標準溶液 (6.25 μ M, ; 12.5 μ M, ; 25 μ M, ; 50 μ M,)。網掛けで示した部分の面積が 6.25 μ M Trolox 標準溶液の net AUC である。

4. 研究成果

I. 抗酸化能測定値の再現性向上に関する研究

ORAC 法では、食品から抗酸化物質を含む抽出液を作成し、そこに含まれている抗酸化物質の総量を Trolox の量に換算する。抽出液の抗酸化能が高い場合は、6.25 ~ 50 μ M の Trolox 標準溶液が示す net AUC に合わせるため適宜希釈をする。しかし、検討の過程で、この際の希釈倍率により、希釈前の抽出液の抗酸化能の計算結果が異なる可能性が生じた。そこで、図 2 に示す 9 種類の抗酸化物質標準品を用いて詳細な検討を行った。

1 mg/mL の濃度で調製した各抗酸化物質の標準品を、図 2 に示す 4 段階の濃度に希釈して測定を行った。各濃度は 6.25、12.5、25、50 μ M の Trolox 標準溶液とほぼ同等の net AUC を示す濃度である。X 軸に Trolox の濃度、Y 軸に net AUC をプロットした検量線から希釈溶液の抗酸化能を算出し、原液

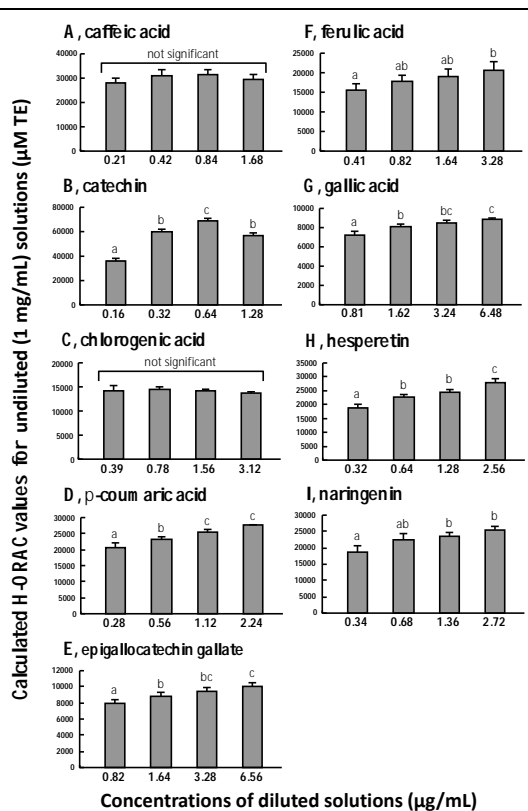


図 2. 希釈液の抗酸化能から逆算した抗酸化物質標準原液 (1 mg/mL) の抗酸化能

平均値 \pm 標準偏差 (n = 3) を示す。異なる文字が付された値は有意差有り (Tukey-Kramer 法、 $p < 0.05$)

(1 mg/mL) の抗酸化能を逆算した (図 2)。その結果、caffeic acid と chlorogenic acid を除き、希釈液を調整する濃度によって、原液の抗酸化能の計算結果が有意に異なり、最大値/最小値は 1.24 ~ 1.92 の範囲であった。*p*-coumaric acid、epigallocatechin gallate、ferulic acid、gallic acid、hesperetin 及び naringenin については、希釈溶液の濃度が高いほど、原液の抗酸化能の結果が大きくなる傾向が認められた。一方、カテキンについては数値の変動に一定の傾向は認められなかった。

希釈液を調整する濃度によって、原液の抗酸化能の計算結果が変動する理由としては、抗酸化物質の濃度 (x) と net AUC (y) が正比例 ($y = ax$) の関係に無く、 $y = ax^b$ で近似される関係となっていることが原因であると考えられた。検体に関する量-反応曲線の定数 b が、Trolox における定数 b とかけ離れているほど、希釈倍率による原液の抗酸化能計算値の変動が大きかった。

従来報告されている ORAC 法 (J. Agric. Food Chem., **51**, 3273-3279 (2003)) では、希釈溶液中に含まれる抗酸化物質量が 6.25 ~ 50 μ M の Trolox 相当量となるように任意で希釈を行うが、上述したように検量線の下限付近となる希釈溶液の測定結果から計算した場合と、上限付近となる希釈溶液の測定結果から計算した場合で、2 倍近く結果に

差が生じる場合がある。測定値の再現性を高めるためには、検体中の抗酸化物質濃度を検量線の範囲内で任意から 1 点に定める必要がある。以上のことから、以降の測定では、各検体の量-反応曲線から 20 μM の Trolox と同等の net AUC を示す希釈倍率を算出し、その結果から ORAC 値を計算することとした。なお、この工夫により分析精度が向上することが室間共同試験によって確認されている (*Anal. Sci.*, **28**, 159-165 (2012))。

II. 動物性食品の抗酸化能の測定

改良した ORAC 測定法を用いて、動物性食品（魚介類、肉類、卵類、乳類）の H-ORAC 値を測定した（表 1）。魚介類は 4.07 ~ 17.99 $\mu\text{mol-TE/g}$ 生鮮重量、肉類は 4.67 ~ 7.30 $\mu\text{mol-TE/g}$ 生鮮重量、卵類は 2.47 ~ 7.23 $\mu\text{mol-TE/g}$ 生鮮重量、乳類は 0 ~ 14.86 の $\mu\text{mol-TE/g}$ 生鮮重量の H-ORAC 値を示した。

著者らは、日本において一般的に食されている野菜の H-ORAC 値は 1.63 ~ 66.07 $\mu\text{mol-TE/g}$ 生鮮重量であり、果物は 1.58 ~ 33.47 $\mu\text{mol-TE/g}$ 生鮮重量であることを明らかにしている (*J. Food Compos. Anal.*, **29**, 25-31 (2013))。各野菜・果物の摂取重量を勘案して H-ORAC 値を加重平均すると、野菜の加重平均値は 6.95 $\mu\text{mol-TE/g}$ 生鮮重量であり、果物の加重平均値は 12.23 $\mu\text{mol-TE/g}$ 生鮮重量であると考えられた。従って、平均的な野菜と同程度の H-ORAC 値を示す動物性食品が多数あり、食事全体からの抗酸化物質摂取量を把握するためには今まであまり重要視されて来なかった動物性食品の AOC に関するデータも蓄積する必要があることが示された。

表 1. 動物性食品の H-ORAC 値

食品番号 ^a	食品名	H-ORAC 値 ($\mu\text{mol-TE/g}$ 生鮮重量)
魚介類		
10134	しらす/生	7.11
10173	さんま/生	8.69
10202	たらこ/生	17.99
10252	きはだ/生	8.73
10345	するめいか/生	6.52
10381	焼き竹輪	7.62
10388	魚肉ソーセージ	4.07
肉類		
11075	うし/輸入牛肉/もも/脂身つき、生	4.67
11130	ぶた/大型種肉/もも/脂身つき、生	5.50
11176	ぶた/ハム類/ロース	6.78
11186	ぶた/ソーセージ類/ウインナー	7.30
11221	にわとり/若鶏肉/もも/皮つき、生	7.26
卵類		
12004	全卵/生	7.23
12018	たまご焼/厚焼きたまご	6.22
12017	たまご豆腐	2.47
乳類		
13003	普通牛乳	ND
13007	乳飲料/コーヒー	5.24
13025	ヨーグルト/全脂無糖	1.21
13040	チーズ類/プロセスチーズ	14.86
13043	アイスクリーム/普通脂肪	2.05

^a 日本食品標準成分表 2010 における食品番号

ND = not detected

III. 動物性食品の抗酸化能に寄与する物質に関する検討: アミノ酸の抗酸化能の測定

野菜・果物等の植物性食品については

H-ORAC 値に寄与する物質として、ポリフェノールが考えられる (*J. Food Compos. Anal.*, **29**, 25-31 (2013))。今回測定した動物性食品の H-ORAC 値に寄与する物質としてアミノ酸を想定し、たんぱく質の構成成分となる 20 種類のアミノ酸の標準品について H-ORAC 値を測定した（表 2）。

含硫アミノ酸であるシステイン及びメチオニン、フェノール性水酸基を有するメチオニン、インドール環を有するトリプトファンに高い H-ORAC 値が認められた。従って、動物性食品の抗酸化能に、これらのアミノ酸を含むたんぱく質が寄与していることが示唆された。ただし、たんぱく質に組み込まれたアミノ酸残基はラジカルとの反応において立体障害を受け、その抗酸化能は遊離のアミノ酸と異なる可能性がある。また、動物性食品と植物性食品で抗酸化能に寄与する物質が異なることから、同じ H-ORAC 値を示す食品を摂取したとしても、動物性食品と植物性食品で生体影響が異なる可能性がある。この点については、本研究の成果である食品の抗酸化能データベースをさらに拡充し、将来的に疫学研究を行って明らかにする必要がある。

表 2. アミノ酸標準品の H-ORAC 値

アミノ酸	H-ORAC 値 ($\mu\text{mol-TE/g}$)
グリシン	ND
アラニン	ND
バリン	ND
ロイシン	9
イソロイシン	ND
セリン	ND
スレオニン	ND
システイン	2223
メチオニン	7122
フェニルアラニン	ND
チロシン	5390
トリプトファン	12682
プロリン	ND
アスパラギン	ND
グルタミン	ND
アスパラギン酸	ND
グルタミン酸	ND
アルギニン	ND
リジン	ND
ヒスチジン	278

ND = not detected

IV. 調理が抗酸化能に及ぼす影響に関する研究

調理が抗酸化能に及ぼす影響について、ゆで卵とパウンドケーキを実際に調理し、調理前後の H-ORAC 値を比較して検討した（表 3）。

ゆで卵は調理により H-ORAC 値が約 30 % 減少したのに対し、パウンドケーキは調理することで H-ORAC 値が約 30 ~ 70 % 増加した。卵については調理前後で食品の重量が大きく変動しないため、H-ORAC 値の変動は含有されている抗酸化成分の質的な変化によるものだと考えられる。卵の抗酸化

能には、たんぱく質中に含まれる一部のアミノ酸残基が寄与していると予想されるが、加熱によりたんぱく質の高次構造が変化し、ラジカルとの反応性に影響した可能性がある。一方、パウンドケーキについては 170 のオーブンで 60 分の加熱を行ったため、水分の揮発により 10 %程度の重量減少が認められた。しかし、調理前後で H-ORAC 値は 30 ~ 70 %増加しており、調理による抗酸化活性の増加は、その一部分しか重量変化で説明することはできなかった。従って、加熱調理時における化学反応で何らかの抗酸化活性を有する化合物が新たに生成している可能性が考えられた。例えば、還元糖とアミノ化合物を加熱することにより生成するメラノイジンは ORAC 活性を示すことが報告されている (*Food Chem.*, **93**, 273-278 (2005))。

表 3. H-ORAC 値に及ぼす調理の影響

名前	調理後	調理前	備考
	H-ORAC 値 ($\mu\text{mol}\cdot\text{TE/g}$)	H-ORAC 値 ($\mu\text{mol}\cdot\text{TE/g}$)	
ゆで卵	5.03	7.23	
パウンドケーキ A	7.07	4.78	プレーン
パウンドケーキ B	7.62	4.48	パンダンリーフ入り
パウンドケーキ C	8.13	6.24	コーン入り
パウンドケーキ D	6.55	4.14	ドリアン入り

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Jun Watanabe, Tomoyuki Oki, Jun Takebayashi, Koji Yamasaki, Yuko Takano-Ishikawa, Akihiro Hino and Akemi Yasui
Method validation by interlaboratory studies of improved hydrophilic oxygen radical absorbance capacity methods for determination of antioxidant capacities of antioxidant solutions and food extracts
Analytical Sciences, **28**, 159-165 (2012)
2. Jun Takebayashi, Tomoyuki Oki, Jun Watanabe, Koji Yamasaki, Jianbin Chen, Maki Sato-Furukawa, Megumi Tsubota-Utsugi, Kyoko Taku, Kazuhisa Goto, Teruki Matsumoto and Yoshiko Ishimi
Hydrophilic antioxidant capacities of vegetables and fruits commonly consumed in Japan and estimated average daily intake of hydrophilic antioxidants from these foods
Journal of Food Composition and Analysis, **29**, 25-31 (2013).
3. Jun Watanabe, Tomoyuki Oki, Jun Takebayashi, Koji Yamasaki, Yuko Takano-Ishikawa, Akihiro Hino and

Akemi Yasui

Improvement of the lipophilic-oxygen radical absorbance capacity (L-ORAC) method and single-laboratory validation
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, **77**, 857-859 (2013)

4. 竹林 純, 沖 智之, 渡辺 純, 山崎光司, 陳 健斌, 古川 (佐藤) 麻紀, 坪田 (宇津木) 恵, 卓 興鋼, 後藤一寿, 松本輝樹, 石見佳子
日本において一般的に食されている野菜・果物の親水性抗酸化能およびこれらの食品からの親水性抗酸化物質一日摂取量の推算
ビタミン, **87**, 274-276 (2013).

[学会発表](計 6 件)

1. 竹林 純, 沖 智之, 松本輝樹, 坪田恵, 卓興鋼, 渡辺 純, 後藤一寿, 陳 健斌, 佐藤麻紀, 石見佳子
一般的な野菜・果物及び市販飲料の H-ORAC 値及びそれらからの親水性抗酸化物質一日摂取量の推算
第 65 回日本栄養・食糧学会大会. (2011 年 5 月 15 日). 東京
2. 竹林 純
一般的な野菜・果物の AOU-P 値と、野菜・果物からの一日親水性抗酸化物質摂取総量の推算
日本食品科学工学会第 58 回大会シンポジウム (招待講演). (2011 年 9 月 10 日). 仙台
3. 渡辺 純, 沖 智之, 竹林 純, 山崎光司, 石川 (高野) 祐子
食品の抗酸化能測定のための親油性・親水性抗酸化物質抽出法の検討
日本食品科学工学会第 58 回大会. (2011 年 9 月 10 日). 仙台
4. Jun Watanabe, Tomoyuki Oki, Jun Takebayashi, Koji Yamasaki and Yuko Takano-Ishikawa
Improvement of hydrophilic oxygen radical absorbance capacity (H-ORAC) method for determination of antioxidant capacities of antioxidant solutions and food extracts
2011 The International Conference on Food Factors (ICoFF). (2011 年 11 月 21 日). Taipei, Taiwan
5. 渡辺 純, 竹林 純, 沖 智之, 山崎光司, 安井明美, 石川 (高野) 祐子
親油性 ORAC 測定法の改良による分析精度の向上
日本農芸化学会 2012 年度大会. (2012 年 3 月 23 日). 京都

6. Jun Takebayashi, Tomoyuki Oki, Jun Watanabe, Koji Yamasaki, Jianbin Chen, Maki Sato-Furukawa, Megumi Tsubota-Utsugi, Kyoko Taku, Kazuhisa Goto, Teruki Matsumoto and Yoshiko Ishimi
Hydrophilic antioxidant capacities of vegetables and fruits commonly consumed in Japan and estimation of daily intake
20th International Congress of Nutrition (ICN), Sep-19, 2013, Granada, Spain

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹林 純 (JUN TAKEBAYASHI)

独立行政法人国立健康・栄養研究所・食品保健機能研究部食品分析研究室・精度管理担当

研究員(主任)

研究者番号: 30421837

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし